

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 11 月 16 日 (16.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/120915 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/409 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
 A61K 31/7135 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
 A61K 47/34 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
 A61K 47/36 (2006.01)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 弘津 一郎 (HI-ROTSU, Ichiro) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 大川 裕紀 (OHKAWA, Yuki) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 野迫 正則 (NOZAKO, Masanori) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 鈴木 佐緒里 (SUZUKI, Saori) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 桑田 有紀子 (KUWATA, Yukiko) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP). 佐藤 誠 (SATO, Makoto) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号ニプロ株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/308829

(22) 国際出願日: 2006 年 4 月 27 日 (27.04.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-140282 2005 年 5 月 12 日 (12.05.2005) JP

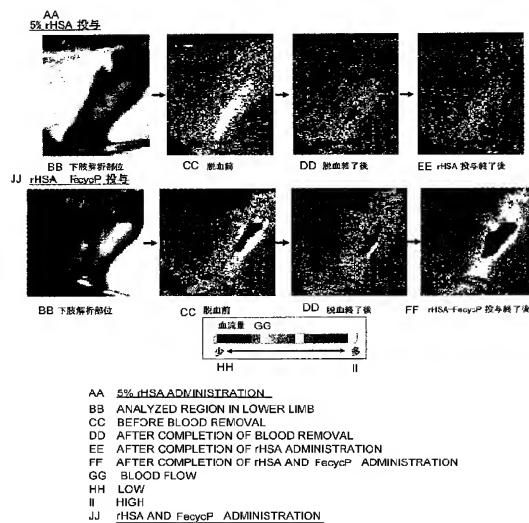
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ニプロ株式会社 (NIPRO CORPORATION) [JP/JP]; 〒5318510 大阪府大阪市北区本庄西 3 丁目 9 番 3 号 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: AGENT FOR IMPROVING CIRCULATORY DISORDER

(54) 発明の名称: 循環障害改善剤



(57) Abstract: It is intended to provide a pharmaceutical capable of efficiently improving blood circulation in a region where a circulatory disorder occurs and fully preventing or improving tissue damage as a preventive or therapeutic agent for the circulatory disorders in general. As a result of the study of pharmacological effects of a compound in which a porphyrin metal complex is included in albumin, it was found that the compound efficiently improves decrease in blood flow in circulatory disorders and fully prevents or improves tissue damage, thus the invention was achieved. That is, the invention is directed to an agent for improving a circulatory disorder comprising the compound in which a porphyrin metal complex is included in albumin.

(57) 要約: 上記の循環障害全般に対する予防または治療薬として、循環障害が生じている部位の血液循環を効率的に改善させ、組織障害を十分に防止または改善できる薬物を提供する。ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物について、薬理効果の研究を行った結果、本化合物が循環障害時の血流低下を効率的に改善し、組織障害を十分に防止または改善することを見出し本発明に到達した。すなわち、本発明は、ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物を含む循環障害改善剤である。



WO 2006/120915 A1



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

循環障害改善剤

技術分野

- [0001] 本発明は、医療分野において、生体における血液の循環障害を改善する薬剤に関する。さらに詳細には、心機能低下、全身性の持続する高血圧、低血圧、循環ショック、および局所の充血、うっ血、乏血あるいは虚血、梗塞、出血等の血流低下に起因する循環障害に対して、血流を増加させ、組織障害を防止または改善する薬剤に関する。

背景技術

- [0002] 血液の循環障害は、中枢性および末梢性に大別され、末梢性はさらに全身性および局所性に分けられる。中枢性血液循環障害とは心臓の機能低下が一次的原因となるもので急性および慢性の左心機能不全および右心機能不全が含まれる。全身性末梢血液循環障害とは血液循環系全体の末梢循環障害で心臓に一次的原因のないものをいい、持続する高血圧、低血圧および循環ショックなどが起因する。局所性末梢血液循環障害は局所の充血、うっ血、乏血あるいは虚血、梗塞、出血等などに伴う障害である。
- [0003] これら循環障害に対する予防または治療薬には、その起因となる病態の治療薬、循環障害の直接的な改善薬として血管拡張剤および血栓溶解剤等が使用されてきたが、全身の血圧低下および血栓溶解後、活性酸素による再灌流組織障害等が生じるため、循環障害が生じている部位の血液循環を効率的に改善させ、組織障害を十分に防止または改善できる薬物はいまだ開発されていない。
- [0004] 一方で、出血性ショックの蘇生液(赤血球代替物)、心筋梗塞等における虚血部位への酸素供給液、移植臓器の灌流液や保存液、人工心肺等の体外循環回路の補填液、再生組織の培養細胞への酸素供給液、癌治療用増感剤等の利用を期待して、種々の人工酸素輸液が研究されている。人工酸素輸液の一例として、ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物が研究されてきた(例えば、特許文献1参照)。

[0005] 特許文献1:特開2004-10495号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上記の循環障害全般に対する予防または治療薬として、循環障害が生じている部位の血液循環を効率的に改善させ、組織障害を十分に防止または改善できる薬物を提供しようとするものである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物について、薬理効果の研究を行った結果、本化合物が循環障害時の血流低下を効率的に改善し、組織障害を十分に防止または改善することを見出し本発明に到達した。

本発明者らは、ポルフィリン鉄錯体をアルブミンに包接させた化合物について、複数の血流低下モデルあるいは虚血モデル動物を用いて検討した結果、いずれのモデルに対しても十分な血流改善効果および組織障害抑制効果を示すことが確認された。

[0008] すなわち、本発明は、

- (1)ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物を含む循環障害改善剤、
- (2)ポルフィリン金属錯体が鉄錯体である、上記(1)記載の循環障害改善剤、
- (3)鉄が2価の状態にある、上記(1)記載の循環障害改善剤、
- (4)アルブミンがヒト血清アルブミンあるいは遺伝子組換え型ヒト血清アルブミンである、上記(1)記載の循環障害改善剤、
- (5)アルブミンが高分子化合物により修飾されている、上記(1)記載の循環障害改善剤、および
- (6)高分子化合物が、ポリエチレングリコール、デキストランおよびポリアミノ酸からなる群から選ばれる少なくとも1種の高分子化合物である、上記(1)記載の循環障害改善剤に関する。

発明の効果

[0009] 本発明の循環障害改善剤は、出血や血管狭窄及び閉塞等による血流量低下時に

、循環障害が生じた部位の血流量を増加させる効果を有する。またその血流量増加効果により、組織障害を改善する効果を有する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は(1)5%rHSA投与、(2)rHSA-FecycP投与の場合の脱血ラットにおける下肢血流低下への作用を比較したレーザードップラー式血流画像化装置による画像である。

[0011] [図2]図2は(1)正常対照、(2)低速灌流による虚血対照、(3)虚血+5%rHSA投与、(4)虚血+rHSA-FecycP投与の場合のラット摘出心臓における虚血性心機能障害に対する改善作用を比較した図である。

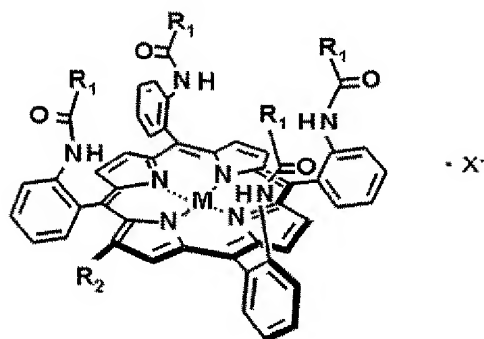
発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明において用いられるポルフィリン金属錯体とは、ポルフィリン誘導体に中心金属が配位した、2位置側鎖を有するテトラフェニルポルフィリン金属錯体である。ポルフィリンとは、4つのピロール環が α 位置で4つのメチン基と交互に結合した大環状化合物とその誘導体である。

[0013] 本発明で用いるポルフィリン金属錯体としては、下記一般式(1)に示すような錯体が好ましい。

一般式(1)

[0014] [化1]



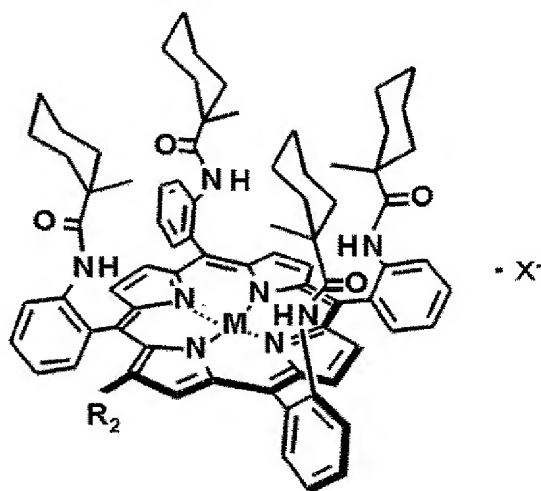
(式中、 R_1 は置換基を有していてもよい鎖式もしくは脂環式炭化水素基、 R_2 は下記一般式(3)で示される置換基、Mは元素周期表第6～10族の遷移金属原子または金属イオン、 X^- はハロゲンイオンを表わし、 X^- の個数は金属イオンの価数から2を差し

引いた数を示す。)

[0015] 本発明のポルフィリン金属錯体では、上記一般式(1)において、 R_1 がシクロヘキサノイル基を含む置換基であるものが好ましく、例えば下記一般式(2)に示すようなポルフィリン金属錯体が好ましい。

一般式(2)

[0016] [化2]

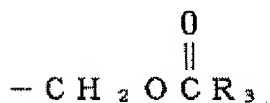


(式中、 R_2 は下記一般式(3)で示される置換基、Mは元素周期表第6～10族の遷移金属原子または金属イオン、 X^- はハロゲンイオンを表わし、 X^- の個数は金属イオンの価数から2を差し引いた数を示す。)

[0017] また、上記一般式(1)または(2)において、2位置の置換基(R_2)としては、下記一般式(3)で示されるものが挙げられる。

一般式(3)

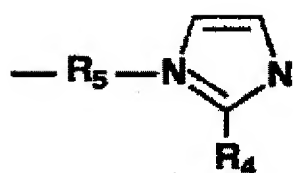
[0018] [化3]



(式中、 R_3 は $C_1 \sim C_{18}$ のアルキル基、または下記一般式(4)で示されるものである。)

一般式(4)

[0019] [化4]



(式中、R₄ はこれが結合しているイミダゾールの中心金属への配位を阻害しない基、R₅ はアルキレン基を示す。)

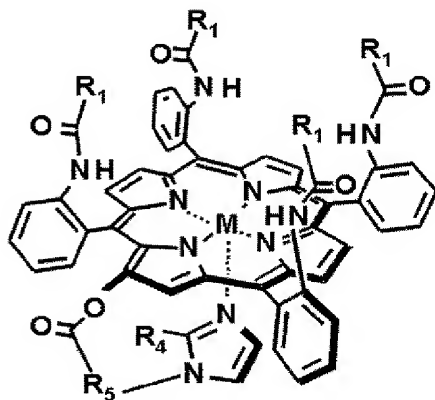
[0020] 前記一般式(4)において、R₄ としては水素、あるいはメチル基、エチル基、またはプロピル基などの低級アルキル基が好ましく、R₅ としてはC₁ ~ C₁₀ のアルキレン基が好ましい。

[0021] 本発明の前記一般式(1)で示されるテトラフェニルポルフィリン金属錯体においては、中心金属(M)に塩基が配位した錯体が好ましい。

また、2位の置換基自体が軸塩基として中心金属に配位したイミダゾール誘導体であることが好ましく、例えば、下記一般式(5)のポルフィリン金属錯体が挙げられる。

一般式(5)

[0022] [化5]



(式中、R₁ は置換基を有していてもよい鎖式若しくは脂環式炭化水素基、R₄ は低級アルキル基、R₅ はC₁ ~ C₁₀ のアルキレン基を示す。Mは鉄、コバルトまたはクロムまたはこれらのイオンを示す。)

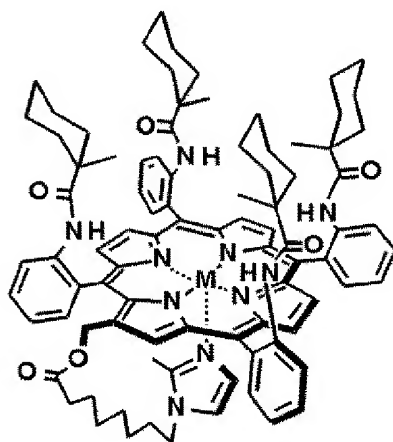
[0023] 本発明のポルフィリン金属錯体における中心金属(例えば、上記一般式(1)におけるM)は、元素周期表第6~10族の遷移金属原子であり、金属イオンの形態であってもよい。そのうち、鉄、コバルト、クロムなどが好ましく、さらに好ましくは2価の鉄(鉄

(II))、3価の鉄(鉄(III))または2価のコバルト(コバルト(II))である。より好ましくは2価の鉄である。

[0024] これらポルフィリン金属錯体の中でも特に、下記一般式(6)で示す、2-[8-(2-メチル-1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル]-5, 10, 15, 20-テトラキス{[α , α , α , α -o-(1-メチルシクロヘキサノイル)]フェニル}ポルフィナト鉄(II)錯体が好ましい。

一般式(6)

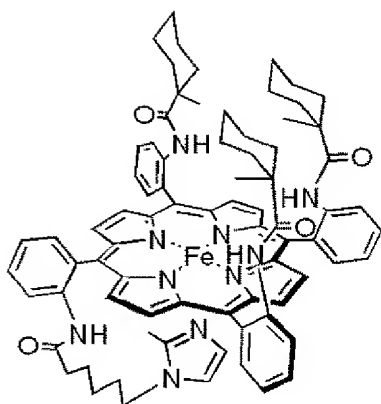
[0025] [化6]



[0026] さらに、本発明に用いるアルブミンとポルフィリン鉄錯体としては、上記一般式(6)で示す2-[8-(2-メチル-1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル]-5, 10, 15, 20-テトラキス{[α , α , α , α -o-(1-メチルシクロヘキサノイル)]フェニル}ポルフィナト鉄(II)錯体(FecycP)の合成過程を短縮することで、合成操作での有害物質の使用を省き、収率を上げる工夫がなされたもの、すなわち、下記一般式(7)で示す、5, 10, 15-トリス(α , α , α -o-シクロヘキサノアミドフェニル)-20-モノ[β -o-6-{N-(2-メチル-1-イミダゾリル)}ヘキサノアミドフェニル]ポルフィリンの中心に鉄が配位した錯体(rHSA-Fecyc3P)が挙げられる。

一般式(7)

[0027] [化7]



[0028] 本発明のポルフィリン金属錯体がアルブミンに包接された化合物とは、アルブミンによって形成される内部疎水領域内にポルフィリン金属錯体が包埋・固定(包接)されたものである。

アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)1モルに対するポルフィリン金属錯体の結合数は、通常約1～8である。アルブミン1モルに包接・結合されたポルフィリン金属錯体の数は、例えば、スカチャード・プロット(Scatchard plot)(C.J. Halfman, T.Nishida, Biochemistry, 11巻, 3493頁(1972)を参照)等を作成することにより決定できる。

[0029] 本発明に用いるアルブミンは、ヒト血清アルブミン、組換えヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等その由来に制限はない。ヒトへの適用を考えた場合、ヒト血清アルブミンまたは遺伝子組換え技術により製造されたヒト血清アルブミン(以下、組換えヒト血清アルブミン)であることが好ましく、特に組換えヒト血清アルブミンであることが好ましい。

[0030] 近年、遺伝子組換え技術の発展により、構造・組成および物理化学的特徴がヒト血清アルブミンと全く同一である高純度の組換えヒト血清アルブミンが開発されてきており(K.Kobayashi et al., Therapeutic Apheresis, 2巻, 257-262頁(1998)参照)、この組換えヒト血清アルブミンに置換ポルフィリン金属錯体を包接させてなる、ポルフィリン金属錯体-組換えヒト血清アルブミン包接化合物は、全合成系として提供できるので、工業的規模での製造も比較的容易である。

また、アルブミンは、血漿タンパク質であるから、生体への適用に優れている。

[0031] さらに、本発明で用いるアルブミンは、高分子化合物で修飾されていることが好ましい。高分子化合物としては、医療用に用いることができアルブミンを修飾することので

きる高分子化合物であれば特に限定されないが、例えば、ポリエチレングリコール、デキストランおよびポリアミノ酸等が挙げられ、好ましくはポリエチレングリコールである。

ポリエチレングリコールとしては、例えば、は1977年にAbuchowskiら(A. Abuchowski et al., Journal of Biological Chemistry, 252巻, 3578-3581頁(1977)およびJournal of Biological Chemistry, 252巻, 3582-3586頁(1977)を参照)により用いられて以来、ペプチド性医薬品の分子修飾に汎用されている高分子であり、生体内半減期の延長に加え、抗原性の低下を目的とした研究例(Y. Kawasaki et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 216巻, 410-414頁(1981)、N. Katre et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84巻, 1487-1491頁(1987)およびM.J. Knauf et al., Journal of Biological Chemistry, 263巻, 15064-15070頁(1988)を参照)が数多く報告されている。

[0032] 本発明の循環障害治療剤は、ポルフィリン金属錯体がアルブミンに包接された化合物を含有する薬剤であり、さらに安定化剤等の添加された種々の医薬組成物も本願発明の範囲に含まれる。

本発明の循環障害治療剤の剤形は、医療用の種々の剤形とすることができるが、注射剤が好ましい。本発明を注射剤として製造する場合は、適当な溶剤、必要に応じて、pH調整剤、緩衝剤、安定化剤、懸濁剤、溶解補助剤、担体等を添加し、常法により注射剤にすることができる。

[0033] 本発明の循環障害治療剤は、種々の疾患・症状に伴う循環障害の治療および予防の為に使用される。種々の疾患・症状としては、高血圧、高脂血症および糖尿病などの疾患、血栓等による血管閉塞および急性出血あるいは慢性出血に伴う虚血症状、虚血後の再灌流障害等、その他に臓器移植が挙げられる。これらに伴う循環障害の例としては、例えば、虚血性脳疾患(脳梗塞、一過性脳虚血発作、脳血栓、脳塞栓)、脳梗塞後遺症、脳血管攣縮、虚血性心疾患(心筋梗塞)、狭心症、閉塞性血栓血管炎(バージャー病)、閉塞性動脈硬化症、血栓性静脈炎、レイノー病およびレイノー症候群、肢端紫藍症、凍瘡・凍傷、肢端知覚異常、間欠性跛行、特発性脱疽、メ

ニエール病、メニエール症候群および眩暈症、慢性動脈閉塞症、虚血性膝炎、虚血性視神経症、虚血性大腸炎等が挙げられる。

- [0034] 本発明の循環障害治療剤は、対象臓器として、例えば、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膝臓、脾臓、腸、骨格筋、骨髄、神経、網膜、血管等に使用することができる。
- [0035] 本発明の循環障害改善剤を注射剤として投与する場合の投与方法としては、例えば静脈内投与、動脈内投与、門脈内投与、病巣内直接投与が挙げられる。
- [0036] 本発明の循環障害改善剤の投与量は、患者の年齢、体重、性別、投与方法、症状によって異なるが、通常成人1人1日あたり、非経口投与(例えば、注射あるいは持続点滴)で約1～2500mL(例えば、FecycPとして、4mg～11g)、好ましくは約1～1000mL(例えば、FecycPとして、4mg～4g)の範囲で投与する。
- [0037] 以下に実施例をあげて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

- [0038] 以下の実施例で用いる、2-[8-(2-メチル-1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル]-5, 10, 15, 20-テトラキス{[α , α , α , α -o-(1-メチルシクロヘキサノイルアミノ)]フェニル}ポルフィナト鉄錯体(II)は、T. Komatsu et al., Bioconjugate Chemistry, 13巻, 397-402頁(2002)に記載の方法により製造した。
- [0039] (製造例1) ポルフィリン鉄錯体のアルブミン包接体の製造
- 一酸化炭素雰囲気下で、2-[8-(2-メチル-1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル]-5, 10, 15, 20-テトラキス{[α , α , α , α -o-(1-メチルシクロヘキサノイルアミノ)]フェニル}ポルフィナト鉄錯体1.07mmolのエタノール溶液1.5Lに0.6MのL-アスコルビン酸水溶液1.5Lを添加して還元し、この液を遺伝子組換えヒト血清アルブミン(以下、rHSAと略す)0.27mmolを含有するリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)6.5Lに加え、攪拌した。その混合液にリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)60Lを加えながら、限外ろ過装置(ミリポア製限外濾過膜:限外分子量30,000)を用いて定容量限外ろ過透析を行い、混合液中に含まれるエタノールを除去した。この混合液を300mLに濃縮後、rHSA濃度が終濃度0.75mM(5w/v%)となるようリン酸緩衝水溶液(pH7.4, 1/30mM)を用いて調製し、所望

のポルフィリン鉄錯体－アルブミン包接化合物の分散液(以下、rHSA－FecycPと略す)を得た。

rHSA－FecycPは酸素ガス(100%)通気下に、500Wハロゲンランプを用いて20分間光照射した後、実験例1および2に使用した。

なお、rHSAは、(株)バイファ製のもの(25w/v%製剤)を用いた。

[0040] (実験例1) ラット出血性血流低下モデルに対する作用

Wistar系雄性ラット(8週齢)を用い、セボフルラン吸入麻酔下(導入2.0%、維持1.5%)に脱血し、血流量を低下させた。右総頸動脈より2mLの脱血、右大腿静脈より2mLの5%rHSAの投与を9回繰り返し、総血液量の約70%量を5%rHSAで交換し、10分後に右総頸動脈より総血液量の30%量を脱血した。脱血終了後、速やかに、rHSA－FecycP、あるいは対照として5%rHSAの総血液量の30%量を右大腿静脈内に投与した。なお、脱血および投与は1mL/分の速度で行った。脱血前、脱血終了直後および投与終了25分後に、下肢の血流量をレーザードップラー式血流画像化装置((株)モンテシステム製、MoorLDI－LKII)を用いて非侵襲下に測定した。得られた結果を画像化し、図1に示す。

[0041] ラットの下肢血流量は、脱血終了後には低下し、5%rHSAを投与しても、血流量の回復は認められず、むしろさらに低下した。一方、rHSA－FecycPは、脱血により低下した血流量を、脱血前とほぼ同程度までに回復した。従って、rHSA－FecycPは出血性の血流量低下に対して血流量を増加させ改善させることが明らかとなった。

[0042] (実験例2) ラット虚血性脳血流低下モデルに対する作用

rHSA－FecycPを投与した場合の両側総頸動脈閉塞ラットの脳血流改善低下に対する改善作用について実験を行った。

Wistar系雄性ラット(10週齢)を用い、ペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg、腹腔内投与)麻酔下に両側総頸動脈を結紮し、脳血流量を低下させた。rHSA－FecycPは10 mL/kgを両側総頸動脈結紮10分後に尾静脈内に投与した。大脳皮質血流量を両側総頸動脈結紮前、結紮直後およびrHSA－FecycP投与終了5分後に、レーザードップラー式血流画像化装置((株)モンテシステム製、MoorLDI－LKII)を用いて非侵襲下に測定した。得られた結果は画像を数値化し、結紮前の値を

100%として表1に示す。

[0043] [表1]

| ラットNo. | 大脳皮質血流量（結紮前を100とした%値） | | |
|--------|-----------------------|------|--------------------------------|
| | 総頸動脈結紮前 | 結紮直後 | rHSA-FecycP 10mL/kg 投与終了5分後 |
| 1 | 100 | 55.4 | 63.7 |
| 2 | 100 | 73.7 | 82.8 |

[0044] 表1の結果から、大脳皮質血流量は、両側総頸動脈結紮前(100%)に比べ、結紮直後には55.4%および73.7%に低下し、rHSA-FecycPの10mL/kgを静脈内投与すると、それぞれ63.7%および82.8%に上昇した。従って、rHSA-FecycPは虚血性脳血流量の低下に対して血流量を増加させ改善させることが明らかとなった。

[0045] (実験例3) 脳血流低下による虚血性脳機能障害に対する作用

rHSA-FecycPを投与した場合の両側総頸動脈閉塞ラットの脳血流低下による虚血性脳機能障害に対する改善作用について実験を行った。

Fischer系雄性ラット(8週齢)を用い、エーテル軽麻酔下に両側総頸動脈を結紮により閉塞し、脳虚血を惹起させた。rHSA-FecycPの1および3mL/kg、あるいは対照として5%rHSAの3mL/kgを両側総頸動脈閉塞直後に尾静脈内に投与し、覚醒下に閉塞終了後3.5時間までの虚血性発作(発作性跳躍および痙攣)発現の有無および24時間後までの生死を観察した。虚血性発作の発現率(発現例数/使用例数×100(%))および死亡率(死亡例数/使用例数×100(%))を指標に薬物の効果を調べた。得られた結果を表2に示す。

[0046] [表2]

| 化合物 | 投与量 (mL/kg) | 例数 | 虚血性発作 発現率(%) | 死亡率 (%) |
|-------------|----------------|----|-----------------|------------|
| 5% rHSA | 3 | 5 | 80 | 100 |
| rHSA-FecycP | 1 | 6 | 33 | 83 |
| | 3 | 6 | 33 | 67 |

[0047] 虚血性発作の発現率は5%rHSAの3mL/kg投与では80%であったが、rHSA

—FecycP の1あるいは3 mL/kg投与ではともに33%を示し、発現率は低下した。また、死亡率はrHSAの3 mL/kg投与では100%であったが、rHSA—FecycPを1あるいは3 mL/kg投与で、それぞれ87あるいは67%を示し、死亡率は低下した。従って、rHSA—FecycPは虚血性脳機能障害に対して改善作用を有することが明らかとなった。

[0048] (実験例4) 低速灌流による虚血性心機能障害の改善作用

Wistar系雄性ラット(8～10週齢)の心臓をペントバルビタールナトリウム麻酔下に摘出し、ランゲンドルフ(Langendorff)の方法に従って大動脈内にカニューレを挿入し、栄養液で灌流した。心機能として心収縮力を測定するために、左心室内に生理食塩液を注入したバルーンを挿入し、得られた圧波形を解析し、左心室内圧の拡張終期圧および最大上昇速度を計測した。栄養液は95%O₂—5%CO₂混合ガスを通気し、37℃に保温したクレブス—ヘンゼライト(Krebs—Henseleit)液(NaCl 118mM、KCl 4.7mM、KH₂PO₄ 1.2mM、MgSO₄ 1.2mM、CaCl₂ 2.5mM、NaHCO₃ 25mM、グルコース 11mM、pH7.4)を用い、20mL/分の流量で20分間灌流し安定化させた。心筋虚血は、流量を1/10(2mL/分)に下げ、60分間低速灌流することによって惹起させた。5%rHSA群(虚血+5%rHSA群、n=7)およびrHSA—FecycP群(虚血+rHSA—FecycP群、n=7)については、低速流量へ切り換えると同時に、5%rHSAおよびrHSA—FecycPをそれぞれ大動脈内に挿入したカニューレの側管より0.2mL/分の速度で60分間、灌流液中に持続適用した。虚血対照群(n=7)については側管から薬液を適用しなかった。

低速灌流終了後、流量を再度20mL/分に戻し、60分間灌流を継続した。心臓は電気刺激装置を用いてペーシング(心拍数330拍/分)を行った。

各々の実験群について、低速灌流開始時から120分経過時までの各時点で、左心室内圧拡張終期圧および左心室内最大上昇速度の測定を行った。

なお比較のため、実験期間中終始20mL/分で灌流した正常対照群(n=7)についても、左心室内圧拡張終期圧および左心室内最大上昇速度を同様に測定した。

左心室内圧最大上昇速度は低速灌流開始時を100%として表した。また各群の左心室内圧拡張終期圧および左心室内最大上昇速度は平均値±標準誤差で表し

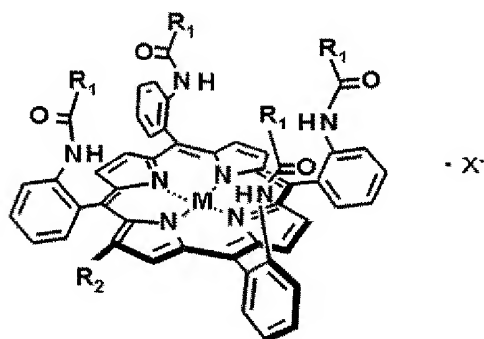
、有意差検定はそれぞれDunnettの検定およびSteelの検定(いずれも有意水準5%)を実施した。得られた結果を図2のグラフに示す。

- [0049] 左心室内圧拡張終期圧は、心収縮力の低下とともに上昇するが、正常対照群では実験中ほぼ一定の値(7.0～11.9mmHg)を示した。虚血対照群では低速灌流虚血開始後徐々に上昇し、虚血60分後に虚血前の流量に戻すとさらに著しい上昇がみられ、虚血再灌流障害を来した。5%rHSA群は虚血対照群とほぼ同じ推移を示した。一方、rHSA-FecycP群は低速流量虚血期間中、虚血対照群と比較し低値を維持し、虚血前の流量に戻すとわずかに上昇したものの、虚血対照群に比べて有意に低下した。
- [0050] 左心室内圧最大上昇速度は、心収縮力の低下とともに低下するが、正常対照群では時間経過とともに徐々に低下し、最大でも約30%の低下に留まった。虚血対照群では低速灌流虚血開始後著しく低下し、虚血60分後に虚血前の流量に戻ると上昇するものの、約60%までしか回復しなかった。5%rHSA群は虚血対照群とほぼ同じ推移を示した。一方、rHSA-FecycP群では低速灌流虚血期間中は虚血対照群とほぼ同じ推移を示したが、虚血前の流量に戻すと、5分後には正常対照群とほぼ同じ値にまで回復した。低速灌流終了後5分、20分および30分には、虚血対照群と比較して有意に高値を示した。従って、rHSA-FecycPは、心臓の虚血および虚血再灌流によって惹起される心機能障害を抑制することが明らかとなった。
- [0051] 以上、rHSA-FecycPは、各種組織において、出血、血管閉塞または血管狭窄などによって低下した血流量を増加させ、機能障害を改善させることから、本剤は循環障害改善剤として有用であることは明らかである。
- [0052] 本願発明の包接化合物は、循環障害治療剤として種々の医療用用途に使用することができ、種々の疾患・症状に伴う循環障害に適用することができる。

請求の範囲

- [1] ポルフィリン金属錯体をアルブミンに包接させた化合物を含む循環障害改善剤。
- [2] ポルフィリン金属錯体が鉄錯体である、請求項1記載の循環障害改善剤。
- [3] 鉄が2価の状態にある、請求項1記載の循環障害改善剤。
- [4] アルブミンがヒト血清アルブミンあるいは遺伝子組換え型ヒト血清アルブミンである、請求項1記載の循環障害改善剤。
- [5] アルブミンが高分子化合物により修飾されている、請求項1記載の循環障害改善剤。
- [6] 高分子化合物が、ポリエチレングリコール、デキストランおよびポリアミノ酸からなる群から選ばれる少なくとも1種の高分子化合物である、請求項1記載の循環障害改善剤。
- [7] ポルフィリン金属錯体が、一般式(1)

[化1]



[式中、 R_1 は置換基を有していてもよい鎖式もしくは脂環式炭化水素基、 R_2 は下記一般式(3)で示される基を示す。

一般式(3)

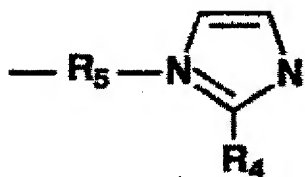
[化2]



(式中、 R_3 は $C_1 \sim C_{18}$ のアルキル基、または一般式(4)で示される基を示す。)

一般式(4)

[化3]

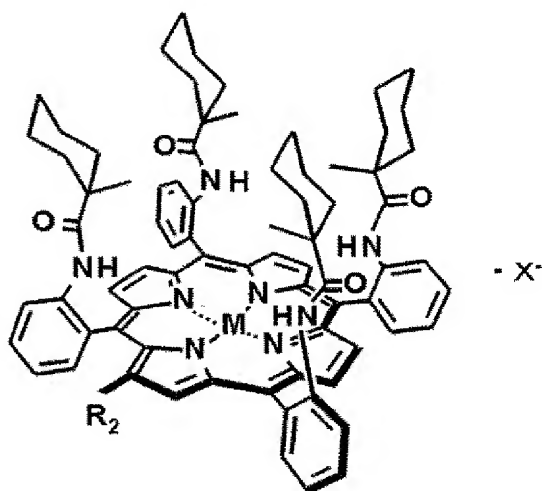


(式中、 R_4 は低級アルキル基、 R_5 は $C_1 \sim C_{10}$ のアルキレン基を示す。)

Mは元素周期表第6～10族の遷移金属原子または金属イオン、 X^- はハロゲンイオンを表わし、 X^- の個数は金属イオンの価数から2を差し引いた数を示す。]で示される化合物である、請求項1記載の循環障害改善剤。

[8] ポルフィリン金属錯体が、一般式(2)

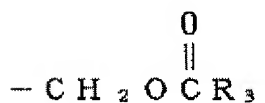
[化4]



[式中、 R_2 は下記一般式(3)で示される基を示す。

一般式(3)

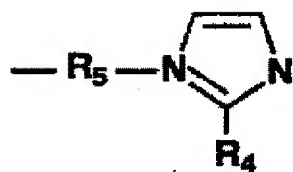
[化5]



(式中、 R_3 は $C_1 \sim C_{18}$ のアルキル基、または一般式(4)で示される基である。)

一般式(4)

[化6]

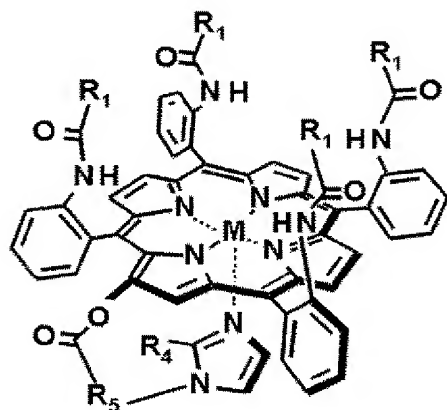


(式中、 R_4 は低級アルキル基、 R_5 は $C_1 \sim C_{10}$ のアルキレン基を示す。)

Mは元素周期表第6～10族の遷移金属原子または金属イオン、 X^- はハロゲンイオンを表わし、 X^- の個数は金属イオンの価数から2を差し引いた数を示す。]で示される化合物である、請求項1記載の循環障害改善剤。

[9] ポルフィリン金属錯体が、一般式(5)

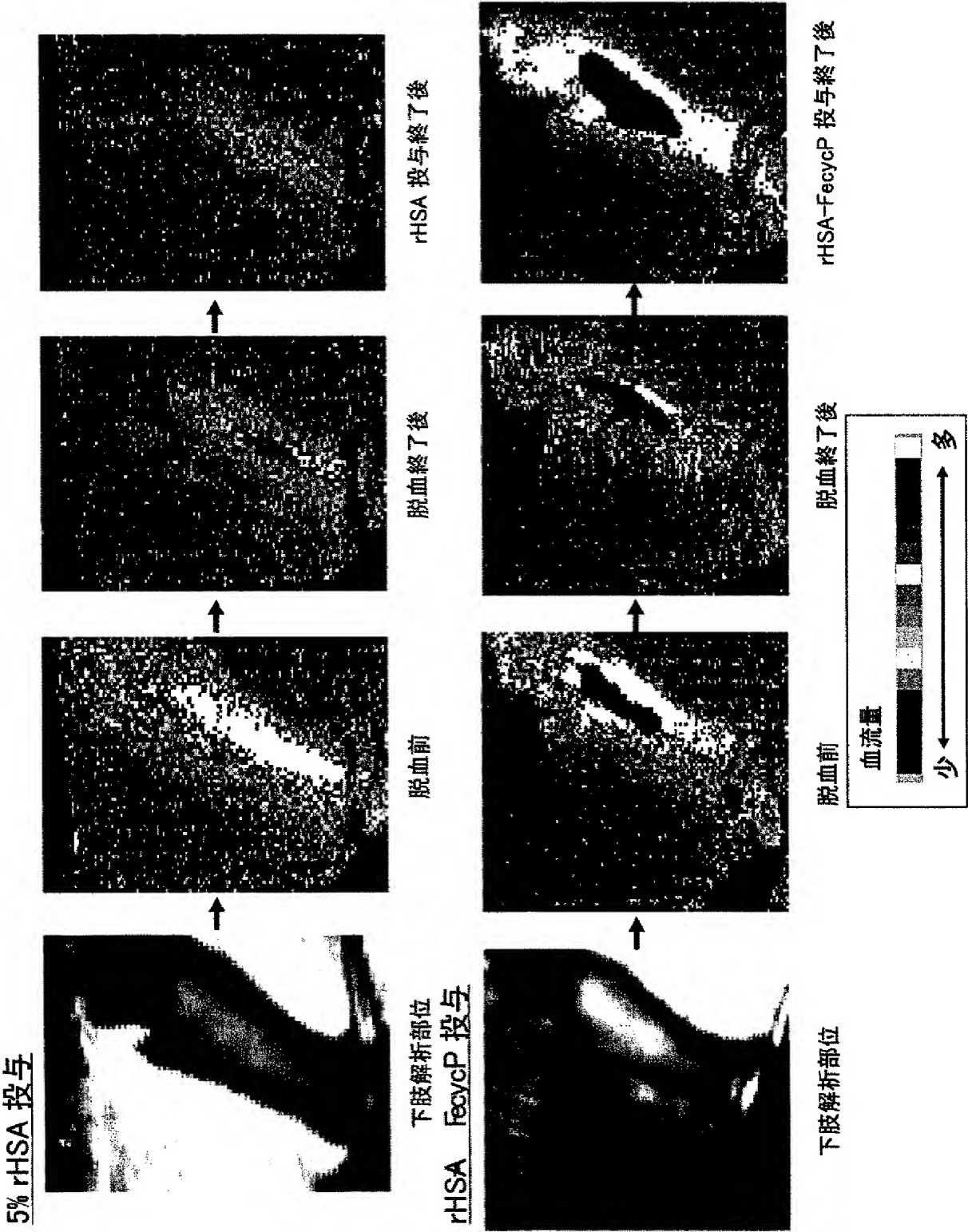
[化7]



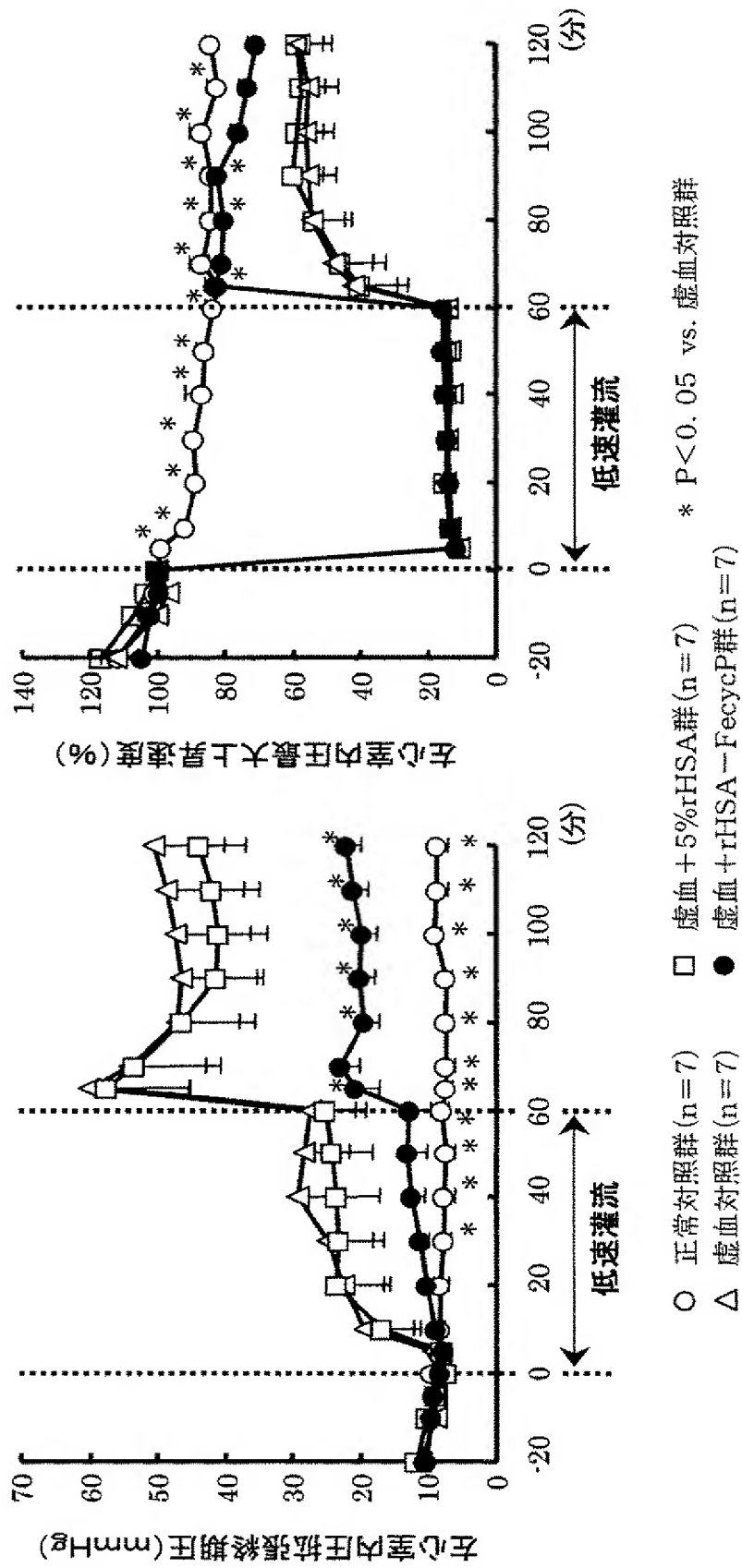
[式中、 R_1 は置換基を有していてもよい鎖式若しくは脂環式炭化水素基、 R_4 は低級アルキル基、 R_5 は $C_1 \sim C_{10}$ のアルキレン基を示す。Mは鉄、コバルトまたはクロムあるいはこれらのイオンを表す。]

[10] 前記金属原子または金属イオンが、鉄、コバルトまたはクロムまたはこれらのイオンである、請求項7または8のいずれかに記載の循環障害改善剤。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/409(2006.01), **A61K31/7135**(2006.01), **A61K47/34**(2006.01), **A61K47/36**(2006.01), **A61K47/42**(2006.01), **A61P9/00**(2006.01), **A61P9/10**(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/409, A61K31/7135, A61K47/34, A61K47/36, A61K47/42, A61P9/00, A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2006 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2006 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2006 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|--------------------------|
| X Y | TSUCHIDA, E., Oxygen-Carrying Plasma Hemoprotein "Albumin-Heme": Nitric Oxide Binding and Physiological Responses after Administration in vivo, Macromol.Symp., (2003.11), Vol.204, pages 13 to 18 | 1-4, 7, 9, 10 5, 6, 8 |
| X Y | TSUCHIDA, E., Exchange Transfusion with Albumin-Heme as an Artificial O2-Infusion into Anesthetized Rats: Physiological Responses, O2-Delivery, and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells, Bioconj.Chem., (2000.01), Vol.11, No.1, pages 46 to 50 | 1-4, 7, 9, 10 5, 6, 8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2006 (19.05.06)

Date of mailing of the international search report
06 June, 2006 (06.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308829

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Chem.Abstr., Vol.141, No.4, (2004), page 1505, 141: 59309r, HONG, M., "PEG and DBBF modified porcine hemoglobin and their oxygen-carrying capacity", Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (2002), Vol.34, No.4, pages 452 to 456 | 5,6 |
| Y | WO 2001/74399 A1 (AJINOMOTO CO., INC., JP), 11 October, 2001 (11.10.01), Pages 12 to 13 & AU 200144602 A & EP 1279405 A1 & US 2003/103934 A1 & JP 2001-572141 A | 5,6 |
| Y | JP 2004-010495 A (NIPRO CORP.), 15 January, 2004 (15.01.04), Pages 5, 14 & WO 2003/101451 A1 & AU 2003241909 A1 & EP 1512399 A1 & KR 2005008789 A & US 2005/222116 A1 & CN 1674891 A | 8 |
| P,X | JP 2006-045173 A (TSUCHIDA, E.), 16 February, 2006 (16.02.06), Pages 16 to 18 & WO 2006/016561 A1 | 1-10 |

| | | | |
|--|---|--|-------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. A61K31/409 (2006. 01), A61K31/7135 (2006. 01), A61K47/34 (2006. 01), A61K47/36 (2006. 01), A61K47/42 (2006. 01), A61P9/00 (2006. 01), A61P9/10 (2006. 01) | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. A61K 31/409, A61K 31/7135, A61K 47/34, A61K 47/36, A61K 47/42, A61P 9/00, A61P 9/10 | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 6 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 6 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 6 年 | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN) | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | |
| X Y | TSUCHIDA E., Oxygen-Carrying Plasma Hemoprotein "Albumin-Heme": Nitric Oxide Binding and Physiological Responses after Administration in vivo, Macromol. Symp. (2003.11), Vol.204, pp.13-18 | 1-4, 7, 9, 10 5, 6, 8 | |
| X Y | TSUCHIDA E., Exchange Transfusion with Albumin-Heme as an Artificial O2-Infusion into Anesthetized Rats: Physiological Responses, O2-Delivery, and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells, Bioconj. Chem. (2000.01), Vol.11, No.1, pp.46-50 | 1-4, 7, 9, 10 5, 6, 8 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 | | | |
| 国際調査を完了した日 1 9 . 0 5 . 2 0 0 6 | | 国際調査報告の発送日 0 6 . 0 6 . 2 0 0 6 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 安藤 倫世 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 1 | 4 P 9 8 3 7 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Chem. Abstr., Vol.141, No.4, (2004) p.1505, 141:59309r, HONG, M., "PEG and DBBF modified porcine hemoglobin and their oxygen-carrying capacity", Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (2002), Vol.34, No.4, pp.452-456 | 5, 6 |
| Y | WO 2001/74399 A1 (AJINOMOTO CO INC, JP) 2001.10.11 (第12-13頁参照) & AU 200144602 A & EP 1279405 A1 & US 2003/103934 A1 & JP 2001-572141 A | 5, 6 |
| Y | JP 2004-010495 A (NIPRO CORP) 2004.01.15 (第5頁, 第14頁参照) & WO 2003/101451 A1 & AU 2003241909 A1 & EP 1512399 A1 & KR 2005008789 A & US 2005/222116 A1 & CN 1674891 A | 8 |
| P, X | JP 2006-045173 A (TSUCHIDA E.) 2006.02.16 (第16-18頁参照) & WO 2006/016561 A1 | 1-10 |